



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Síntese de Compostos Peptidomiméticos Contendo Resíduos dos
Aminoácidos Histidina, Tirosina e Aspartato.**

Clariana de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Joussef

Florianópolis, novembro de 2005.

***"O verdadeiro ato de descobrir
não consiste em encontrar terras
novas, mas em olhar com outros
olhos as terras existentes".***

Marcel Proust

***"Brave Mädchen kommen in
den Himmel, böse Mädchen
kommen überall hin."***

Mov. Feminista Alemão, 1980

***"Ou encontramos um caminho,
ou abrimos um."***

Aníbal

AGRADECIMENTOS

*A mãe mais verdadeira, especial e corajosa do mundo, Herondina Felber Cordeiro;

*Aos meus irmãos Celso Fábio, Túlio César e Cláudio Luiz Cordeiro, a minha cunhada Fabiana S. Cordeiro e as minhas sobrinhas amadas, Gabriela e Rafaela S. Cordeiro;

*Aos amigos, Patty, Tuim, Paola, Mika, Márcio, Côco, Ogo, Camila, Sílvia, Stela, Lala, Eduardo e Marcelo;

*Ao querido amigo Sandro Lúcio Mireski;

*Ao meu orientador Prof. Antônio Carlos Joussef;

*A galera do lab. Luka, Gaúcho, Luciano, Tula, Márcia, Gustavo e Lidiane;

*Aos Profs. Augusto S. Ceccato, Valdir R. Correia, Wilson Erbs, Eduardo Antônio Pinheiro, Maria Marta de Souza Sierra, Dílson Roque Zanette, Marina Uieara e Adailton Bortoluzzi;

*Aos funcionários do Departamento de Química, especialmente Sassá, Denio, Marilene, Seu Pedro, Nezi e a ex-funcionária Luci;

*A galera quente do Centro Acadêmico Livre de Química, Thomazzi, Clito, Juan, Mmol, Tiago, Edna, Renatinha e Carol;

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	viii
1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1 – ENZIMAS.....	01
1.1.1 – Metaloproteínas e Metaloenzimas.....	03
1.2 – OS AMINOÁCIDOS HISTIDINA, SERINA, TIROSINA E ASPARTATO.....	06
1.2.1 – Histidina.....	06
1.2.2 – Serina.....	06
1.2.3 – Tirosina.....	07
1.2.4 – Aspartato	07
1.3 – SÍNTESE DE PEPTÍDEOS E SEUS ANÁLOGOS.....	08
2 – OBJETIVOS.....	10
2.1 – Objetivos Gerais.....	10
2.2 – Objetivos Específicos.....	10
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
3.1 - Síntese do composto 2-[(2-hidroxifenilmetil)-amino-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)]propanoato de metila – (1).....	11
3.2 – Síntese do composto Ácido 2-[(2-hidroxi-5-metilfenil)metil)amino-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)]propanóico – (2).....	17
3.3 - Síntese do composto 2-[(2-hidroxibenzoil)amino-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)]propanoato de metila – (3).....	22
4 – CONCLUSÃO.....	28
5 – PARTE EXPERIMENTAL.....	29
5.1 – Materiais e Métodos.....	29
5.2 - Procedimentos empregados nas sínteses.....	29
5.2.1 – Metil-2-amino-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)propanoato dihidroclorato – (A).....	29
5.2.2 – Ácido 2-[(2-hidroxifenilmetil)-amino-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)]propanóico – (D)	30
5.2.3 – 2-[(2-hidroxibenzoil)amino-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)]propanoato de metila –	

(1).....	31
5.2.4 – Ácido 2-[[{(2-hidroxi-5-metilfenil)metil}amino-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)]propanóico – (2).....	32
5.2.5 – 2-[(2-hidroxifenilmetil)-amino-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)]propanoato de metila – (3).....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das proteases quimotripsina, tripsina e elastase.....	03
Figura 2 – Mecanismo de catálise das serine proteases.....	03
Figura 3 – Complexo de Fe – porfirina.....	04
Figura 4 – Estrutura cristalina do sítio ativo da urease de <i>Klebsiella aerogenes</i>	05
Figura 5 – Representação reduzida da estrutura do sítio ativo de PAP's, onde M^{II} : Zn^{II} (soybean, feijão vermelho), Mn^{II} (batata doce) e Fe^{II} (mamíferos).....	06
Figura 6 – Mecanismo de formação do composto (B).....	12
Figura 7 – Mecanismo de formação da ligação amida	13
Figura 8 – Espectro de IV do composto (1) em pastilha de KBr.....	13
Figura 9 – Espectro de RMN 1H do composto (1) em DMSO- d_6	14
Figura 10 – Espectro de RMN 1H do composto (1) em DMSO- d_6 com D_2O	15
Figura 11 – Espectro de RMN ^{13}C do composto (1) em DMSO- d_6	16
Figura 12 – Mecanismo de formação da base de Schiff.....	17
Figura 13 – Interação entre os orbitais LUMO da ligação C=N (π) e HOMO da ligação B-H (σ).....	18
Figura 14 – Espectro de IV do composto (2) em pastilha de KBr.....	19
Figura 15 – Espectro de RMN 1H do composto (2) em $D_2O/NaOD$	20
Figura 16 – Espectro de RMN ^{13}C do composto (2) em $D_2O/NaOD$	21
Figura 17 – Mecanismo de esterificação do composto (D).....	22
Figura 18 – Espectro no IV do composto (3) em pastilha de KBr.....	23
Figura 19 – Espectro de RMN 1H do composto (3) em DMSO- d_6	24
Figura 20 – Espectro de RMN ^{13}C do composto (3) em DMSO- d_6	25
Figura 21 – Método usado para redução do composto (3).....	26
Figura 22 – Espectro de ^{13}C em DMSO- d_6 , do produto isolado da redução com $LiAlH_4$	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação Internacional das Enzimas.....	02
Tabela 2 – Sinais do espectro de RMN de ^1H do composto (1)	14
Tabela 3 – Sinais do espectro de RMN de ^{13}C do composto (1)	16
Tabela 4 – Sinais do espectro de RMN de H^1 do composto (2)	20
Tabela 5 – Sinais do espectro de RMN de ^{13}C do composto (2)	21
Tabela 6 – Sinais do espectro de RMN de ^1H do composto (3)	24
Tabela 7 – Sinais do espectro de RMN de ^{13}C do composto (3)	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ -	deformação angular (IV)
δ_{H} -	deslocamento químico (RMN H^1)
δ_{C} -	deslocamento químico (RMN C^{13})
ν -	estiramento (IV)
Ar -	aromático
Asn -	asparagina
Asp -	aspartato
CHN -	análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio
d -	duplete
DMSO-d₆ -	dimetilsulfóxido deuterado
g -	grama
h	hora
His -	histidina
Im -	imidazol
Lys -	lisina
m -	multiplete
s -	singleto
Ser -	serina
t -	tripleto
Tyr -	tirosina

RESUMO

Após a descoberta de inúmeras proteínas e enzimas que requerem a presença de um ou mais íons metálicos para exercerem suas atividades metabólicas, os químicos orgânicos têm sintetizado e caracterizado diversos ligantes mono e binucleantes candidatos à esfera de coordenação de modelos destas estruturas.

Este trabalho apresenta a síntese dos compostos **(1)** (2-[(2-hidroxibenzoil)amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)]propanoato de metila), **(2)** (Ácido 2-[(2-hidroxi-5-metilfenil)metil)amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)]propanóico) e **(3)** (2-[(2-hidroxifenilmetil)-amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)]propanoato de metila) utilizando metodologias clássicas de síntese de amidas, aminas e ésteres.

Os compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho (IV), análise elementar (CHNS) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C).

No futuro, os compostos serão utilizados para síntese de novos complexos na procura de modelos sintéticos estruturais e/ou funcionais de metaloenzimas que contenham estes resíduos de aminoácidos em seu sítio ativo.

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são as moléculas biológicas mais abundantes e estão presentes nos organismos vivos em grande diversidade. Formadas a partir de combinações e seqüências de um conjunto de 20 diferentes aminoácidos básicos unidos por ligações amídicas, possuem as mais variadas atividades biológicas e são constituintes de todas as partes das células vivas. Alguns dos “produtos” formados pelo diferente arranjo destes blocos incluem hormônios, anticorpos, fibras musculares, enzimas entre muitos outros.^{1,2}

1.1. ENZIMAS

As enzimas, formadas na sua grande maioria por proteínas altamente especializadas, possuem papel central em todos os processos biológicos. São biopolímeros que catalisam centenas de reações químicas necessárias para manutenção da vida, de maneira organizada e sustentável.^{1,2}

As enzimas compartilham características peculiares e particulares como: o alta especificidade por seus substratos, alto poder catalítico (as velocidades das reações catalisadas são da ordem de $10^5 - 10^{17}$ vezes maiores que das reações não catalisadas) e atuação em soluções aquosas com condições suaves de temperatura e pH. Na maioria dos casos, somente alguns resíduos de aminoácidos são responsáveis pela atividade catalítica da enzima, porém, existem outros nos quais é necessária a presença de uma outra espécie química para ativação da mesma. Dentre estas espécies estão incluídos os chamados cofatores, íons metálicos como Cu^{2+} , K^+ , Fe^{2+} ou Fe^{3+} , Ni^{2+} e moléculas orgânicas ou metalôrgânicas complexas chamadas de coenzimas. Um íon metálico ou coenzima ligado diretamente à enzima é chamado de grupo prostético.¹⁻⁴

As enzimas são classificadas em seis diferentes classes de acordo com a reação química que catalisam, conforme mostrado na Tabela 1.² Cada uma destas classes contém sub-classes, determinadas a partir do tipo específico de substrato envolvido no processo.

Tabela 1- Classificação Internacional das enzimas²

Número	Classe	Reação envolvida
1	Oxidoredutases	Catalisam reações de oxiredução.
2	Transferases	Catalisam a transferência de grupos como metil, amino, acetil de uma molécula a outra.
3	Hidrolases	Catalisam a clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C e algumas outras incluindo ligações anidrido fosfórico.
4	Liases	Catalisam a clivagem de ligações C-O, C-N, C-C e outras por eliminação, clivagem de duplas ligações ou anéis e adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Catalisam a transferência de grupos dentro de uma molécula produzindo formas isoméricas.
6	Ligases	Catalisam a formação de ligações C-O, C-N, C-C e C-S por reações de condensação acopladas à clivagem de ATP.

Como exemplo, as serina proteases, quimotripsina, tripsina e elastase (Figura 1), enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas (amidoidrolases) no processo de absorção de nutrientes no intestino delgado. O sítio ativo destas proteases, responsável pela atividade catalítica destas enzimas, é conhecido como tríade catalítica e formado pelos resíduos aspartato (Asp102), histidina (His57), e serina (Ser195). A catálise acontece pela formação do sistema de transferência de carga Asp102 e His57, capaz de remover o próton do resíduo vizinho Ser195, tornando-o um forte nucleófilo que, por sua vez, ataca a carbonila da ligação peptídica dando início ao mecanismo de hidrólise (Figura 2).¹⁻³

Mesmo antes de serem conhecidas nos termos atuais, as proteínas e enzimas já eram reconhecidas como indispensáveis e presentes com grande diversidade em toda forma de vida na Terra. Ainda há muito a ser descoberto sobre as proteínas, seu “código” de aminoácidos, seus sítios ativos e funções, porém a imaginação ilimitada do químico e suas ferramentas são suficientemente capazes de caracterizar estruturas naturais, desenvolver e construir peptídeos sintéticos com propriedades novas e específicas.

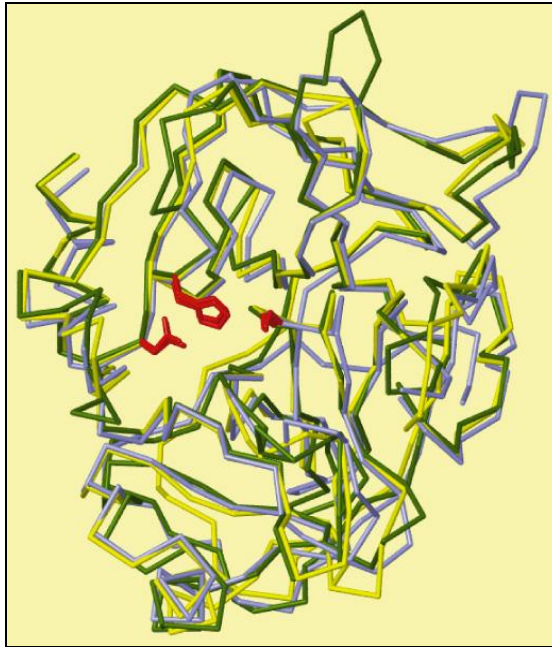


Figura 1 - Estruturas das proteases quimotripsina (azul), tripsina (amarelo) e elastase (verde).

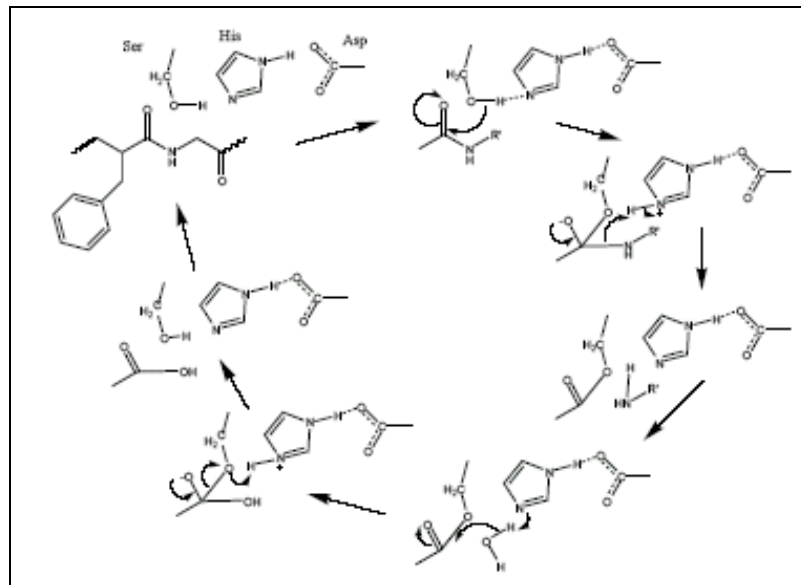


Figura 2 – Mecanismo de catálise das serina proteases.

1.1.1. Metaloproteínas e Metaloenzimas.

Alguns sistemas metálicos como Fe^{3+} - Fe^{2+} são constituintes naturais de proteínas responsáveis por funções como: transporte de oxigênio, transferência de elétrons e formação estrutural de genes. Na hemoglobina e mioglobina (proteínas responsáveis pelo mecanismo de respiração dos mamíferos), o complexo de Ferro-Porfirina captura as moléculas de dioxigênio reversivelmente, levando a formação do superóxido derivado da forma oxidada do metal, que retorna a forma original quando o O_2 é liberado (Figura 3).⁵

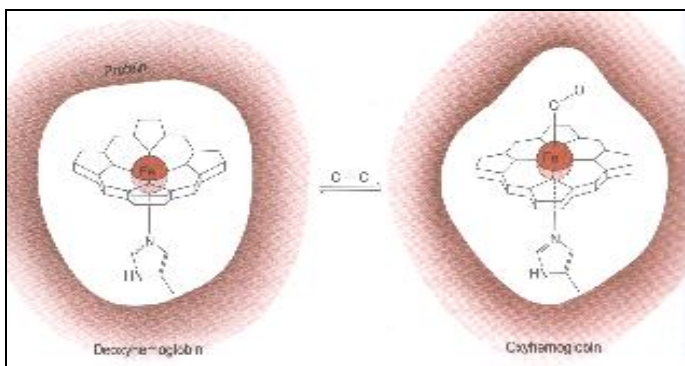


Figura 3 – Complexo de Fe – porfirina.

Os metais também são os grupos prostéticos mais comumente encontrados, ocorrendo em cerca de 1/3 das enzimas conhecidas. Nas metaloenzimas o grupo prostético é formado por um ou mais centros metálicos ligados covalentemente a cadeias laterais proteicas, que desempenham funções catalíticas específicas. São biopolímeros organizados de maneira a formar um envoltório protéico (sítio ativo) que aloja o íon metálico, formando complexos altamente elaborados. Dentro da classe das metaloidrolases podemos destacar a Urease e as Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAP's).^{5,6}

A Urease (uríamidoidrolase) pertence a uma família de metaloidrolases binucleares e contém íons Ni^{2+} , sendo a mesma denominada de catalisador biológico para decomposição hidrolítica da uréia em amônia e bicarbonato.^{6,7} A caracterização da estrutura cristalina por difração de raios X da Urease encontrada na bactéria *Klebsiella aerogenes* mostrou que o sítio catalítico desta enzima é formado por resíduos de

His246 e His272 coordenados ao átomo de Ni1 e His134, His136, Asp360 e uma molécula de água, coordenados ao átomo de Ni2. Os centros metálicos são unidos em ponte por um grupo carbamato de um resíduo de Lys217 (Figura 4).⁸

Encontradas numa grande variedade de tecidos provenientes de mamíferos, plantas e fontes microbianas, as PAP's são um conjunto de metaloidrolases que, *in vitro*, catalisam a hidrólise de ésteres e anidridos ativados do ácido fosfórico, como o trifosfato de adenosina (ATP), numa faixa de pH entre 4 e 7.⁹ O sítio catalítico destas enzimas é formado por um complexo binuclear de $\text{Fe}^{3+} - \text{M}^{2+}$, onde o M^{2+} varia de acordo com a origem da enzima, Zn^{2+} e Mn^{2+} são encontrados em PAP's de origem vegetal (feijão vermelho e batata doce, respectivamente) enquanto Fe^{2+} é encontrado em PAP's de origem animal (mamíferos). De acordo com dados sobre a estrutura cristalina destes compostos, apresentados na literatura, as PAP's de origem tanto animal quanto vegetal possuem a mesma esfera de coordenação em seus sítios ativos: o átomo de Fe^{3+} é coordenado por resíduos de histidina (His), tirosina (Tyr), aspartato (Asp) e um íon hidróxido, enquanto o átomo M^{2+} é coordenado por dois resíduos de histidina (His), um de asparagina (Asn) e uma molécula de água. A representação reduzida do sítio ativo de algumas PAP's é dada na figura 5.^{6,10-12} Metaloenzimas como as PAP's têm sido usadas como excelente ponto de partida para desenvolvimento de nova classe de complexos sintéticos chamados de hidrolases sintéticas e/ou nucleases químicas, capazes de clivar as ligações fosfodiéster das moléculas de DNA e RNA.⁶

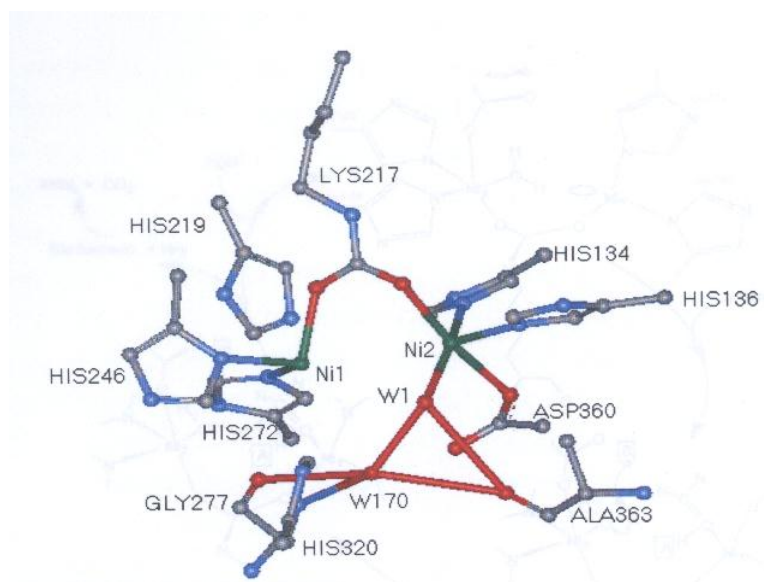


Figura 4 – Estrutura cristalina do sítio ativo da urease de *Klebsiella aerogenes*

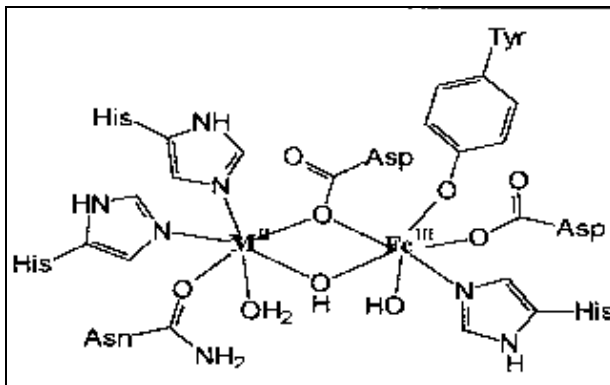


Figura 5 – Representação reduzida da estrutura do sítio ativo de PAP's, onde M^{2+} : Zn^{2+} (semente de soja, feijão vermelho), Mn^{2+} (batata doce) e Fe^{2+} (mamíferos).

1.2. OS AMINOÁCIDOS HISTIDINA, SERINA, TIROSINA E ASPARTATO

1.2.1. Histidina

O aminoácido essencial histidina tem papel fundamental em muitas funções biológicas. Dentre estas, o desenvolvimento e a manutenção da mielina, estrutura que envolve células nervosas, responsável pela comunicação do cérebro com o corpo e a regulação dos níveis de metais essenciais como zinco, ferro, cobre e níquel. Pode-se destacar também a produção de histamina, responsável pelo estímulo do sistema imunológico frente à infecções e também pela liberação de enzimas digestivas. A histidina é essencial para formação de proteínas e enzimas, como a *superóxido dismutase* (enzima antioxidante), *ferritin* (proteína responsável pelo armazenamento de ferro) e *hemoglobina* (formadora das células vermelhas do sangue).^{2,13,14}

A histidina tem papel único na catálise enzimática. O átomo de nitrogênio azometino na cadeia lateral do imidazol, com pKa 7,0 permite que este aminoácido atue tanto como ácido ou base em pH neutro. A ressonância no anel é a grande responsável por esta propriedade, pois permite que ambos átomos de nitrogênio participem igualmente na estabilização da carga desenvolvida no anel.^{1,15}

1.2.2. Serina

A serina, aminoácido não essencial derivado da glicina, tem papel especial na manutenção da saúde mental e física. Está ligada à formação dos fosfolípidos, necessários para produção de todas as células do corpo e também participa na produção de imunoglobinas e anticorpos. É precursora do triptofano, aminoácido usado para produção da substância reguladora das funções de humor no cérebro, a *serotonina* e também participa na absorção de *creatina*, responsável pela construção e manutenção de tecidos musculares, incluindo os do coração.^{2,14}

Juntamente com a histidina e a aspartato, forma o sítio ativo de uma importante classe de enzimas digestivas chamadas de *serina proteases*, responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas no intestino delgado. O caráter nucleofílico do álcool (potencializado pela ligação de hidrogênio com a histidina ou outro aminoácido) é determinante para a ação deste aminoácido no organismo. Um exemplo é o mecanismo de ação da *quimotripsina* (uma *serina protease*) ilustrado de maneira simplificada na Figura 2.^{2,14,16}

1.2.3. Tirosina

Sintetizado biologicamente a partir da fenilalanina (Phe), o aminoácido não essencial tirosina (Tyr) esta intimamente ligado à maioria dos impulsos produzidos pelo sistema nervoso. Juntamente com seu precursor, participa na formação dos neurotransmissores dopamina, epinefrina e norepinefrina, responsáveis pelo controle do humor, apetite e sensibilidade à dor.^{2,13}

A Tyr é o aminoácido precursor do hormônio tiroxina, produzido na glândula tireóide, responsável dentre outros, pelo crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso. Os processos metabólicos que utilizam este aminoácido, como a regulação da atividade catalítica de certas enzimas, dependem basicamente do éster de fosfato formado pelo seu resíduo fenólico.^{1,14}

1.2.4. Aspartato

O L-aspartato Asp é um aminoácido dicarboxílico não essencial encontrado em fluídos animais e vegetais. É formado através da transaminação do oxaloacetato intermediário no ciclo de Krebs e serve como precursor na síntese biológica de purinas, pirimidinas, ácidos nucleicos e o aminoácido L-arginina.²

Uma de suas principais funções no organismo é o transporte de cátions minerais como Mg^+ , K^+ , Zn^{2+} e Ca^{2+} para o interior das células (processo de osmose), e a produção de energia para trabalho muscular, onde ele participa tanto como substrato (Ciclo de Krebs) ou como estimulante (Ciclo do nucleotídeo purina).^{2,14}

O resíduo ácido, neste aminoácido negativamente carregado, participa através de interações iônicas da estabilização da estrutura de algumas proteínas e também como ponte entre íons metálicos como nas PAP's e Ureases.^{2,6,14}

1.3. SINTESE DE PEPTÍDEOS E SEUS ANÁLOGOS

Existe uma grande variedade de reações clássicas descritas na literatura para formação da função amida. Dentre elas, reações de substituição onde o grupo carboxílico ou éster é convertido em seu agente acilante (cloretos ou azotetos de acila) e também reações de adição, onde o intermediário acil é formado *in situ* na presença do componente amino, pela reação com agentes ativadores como DCC e reagentes fosforados. Em ambos métodos temos como resultado o aumento da eletrofilicidade no átomo de carbono da carbonila, que conseqüentemente torna-se mais reativo frente as reações com o grupo amino ou outros nucleófilos.^{17,18}

A síntese de peptídeos é ferramenta essencial no desenvolvimento de análogos sintéticos de proteínas e metaloproteínas, na qual se objetiva a obtenção de grupos protéicos de baixo peso molecular que mimetizem as propriedades estruturais e funcionais destes sistemas biológicos. Embora não se possa subestimar a contribuição de todos os componentes de uma metaloenzima, os modelos de ligantes propostos

recentemente na literatura, têm apresentado resultados satisfatórios e contribuído muito para o desenvolvimento da bioinorgânica como ciência.

Além disso, a síntese química de análogos de peptídeos naturais tem várias aplicações e elevado potencial em áreas biológicas afins como medicina e farmacologia, no desenvolvimento de novos medicamentos (controle da dor, da fertilidade, na terapia do câncer, em doenças causadas por agentes patogênicos) e a possibilidade de ser aplicada a qualquer modelo, dependendo somente da atividade que se deseja alcançar, ou seja, a ativação ou inibição seletiva a ser mimetizada.¹⁹

Uma limitação sempre presente, tratando-se de síntese orgânica, é a presença de diferentes grupos funcionais na molécula, tornando necessário, na maioria das vezes, a adaptação de procedimentos descritos na literatura. Em relação direta a este trabalho pode-se destacar os grupos imidazol e fenol. O imidazol, de forte caráter básico e nucleofílico, pode criar muitas dificuldades e limitações no uso da histidina em síntese orgânica, pois além de seu reconhecido caráter ambivalente (ácido/base), também é bastante reativo frente à substituição nucleofílica, podendo levar a formação de sub-produtos nas reações deste aminoácido. O grupo hidróxi do fenol, por sua vez, é reativo frente à agentes acilantes, alquilantes e também pode aumentar a susceptibilidade do anel frente ao ataque eletrofílico, criando outra barreira para a síntese de peptídeos.¹⁷

Um pequeno número de metodologias têm sido aplicadas realmente nesta área, pois como enfatizado anteriormente, a presença de diferentes grupos funcionais na molécula (imidazol, fenol e outros) torna necessário a utilização de protocolos de proteção/desproteção destes grupos. Este fator, torna urgente a ampliação dos projetos de pesquisa relacionados a estes compostos, uma vez que os mesmos possuem extremo potencial biológico, podendo contribuir diretamente para a melhoria da qualidade de vida humana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

2.1.1 – Sintetizar e caracterizar compostos polifuncionais, contendo resíduos dos aminoácidos histidina, aspartato e tirosina.

2.1.2 – Empregar os compostos sintetizados, no futuro, em estudos sobre a formação de complexos modelos funcionais e/ou estruturais de metaloenzimas como Urease e PAP's.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1 – Sintetizar e caracterizar o composto 2-[(2-hidroxifenilmetil)-amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)]propanoato de metila – **(1)**.

2.2.2 – Sintetizar e caracterizar o composto Ácido 2-[(2-hidroxi-5-metilfenil)metil]amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)]propanóico – **(2)**.

2.2.3. – Sintetizar e caracterizar o composto 2-[(2-hidroxibenzoil)amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)]propanoato de metila – **(3)**.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese do composto 2-[(2-hidroxifenilmetil)-amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)]propanoato de metila – (1)

A maioria dos métodos descritos na literatura para formação da ligação peptídica envolve o acoplamento entre intermediários ativados de ácidos carboxílicos e o grupo amino desejado.

A ativação do grupo carboxílico pela formação de cloretos de acila, usando reagentes como cloreto de tionila (SOCl_2) e pentacloreto de fósforo (PCl_5) sob condições brandas, é um dos métodos pioneiros que, ainda hoje, tem importante papel na síntese de peptídeos. A reação acontece através do ataque nucleofílico do ácido carboxílico ao reagente clorado, levando à formação irreversível do Cloreto de Acila desejado, SO_2 e HCl gasosos.^{17,20}

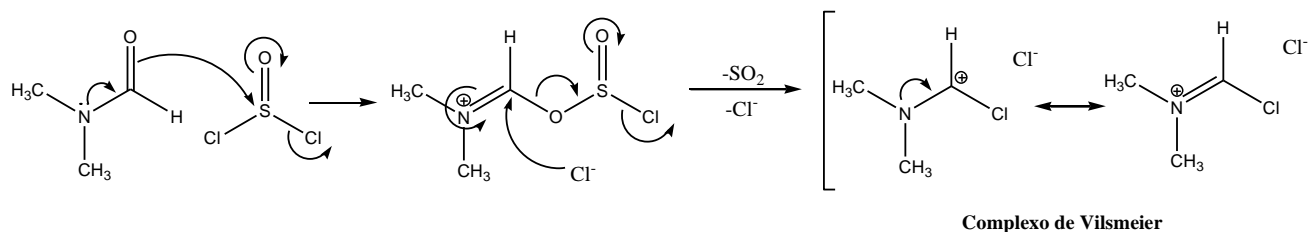
Formamidas *N,N*-disubstituídas, como DMF, são capazes de catalisar a formação dos cloretos ácidos através do chamado reagente de Vilsmeier, formado entre o SOCl_2 e a dimetilformamida (DMF). Este sal de halometilímínio possui caráter mais eletrofílico que o SOCl_2 e é rapidamente atacado pelo ácido carboxílico, conforme o mecanismo descrito por Zaoral.²¹ Uma característica importante destes compostos é sua quimiosseletividade frente a ácidos carboxílicos, o que justifica o uso deste método para formação de cloretos ácidos a partir de moléculas contendo outras funções como cetonas e ésteres alifáticos.^{20,22}

O cloreto de acila é um eletrófilo altamente reativo que na presença de aminas, em solventes orgânicos, leva à formação de amidas com rendimentos satisfatórios.

O método utilizado para formação do composto **(1)**, de acordo com a metodologia clássica de formação de ligações amídicas a partir de cloretos ácidos descrito na literatura,^{17,20} permitiu sua obtenção em 39% de rendimento, sendo considerada por tanto, eficaz para preparação da amida de interesse.

A reação de formação do cloreto de saliciloíla segue um mecanismo de substituição nucleofílica, conforme mostrado na Figura 6.²²

Etapa 1: Formação do complexo de Vilsmeier



Etapa 2: Reação com ácido salicílico

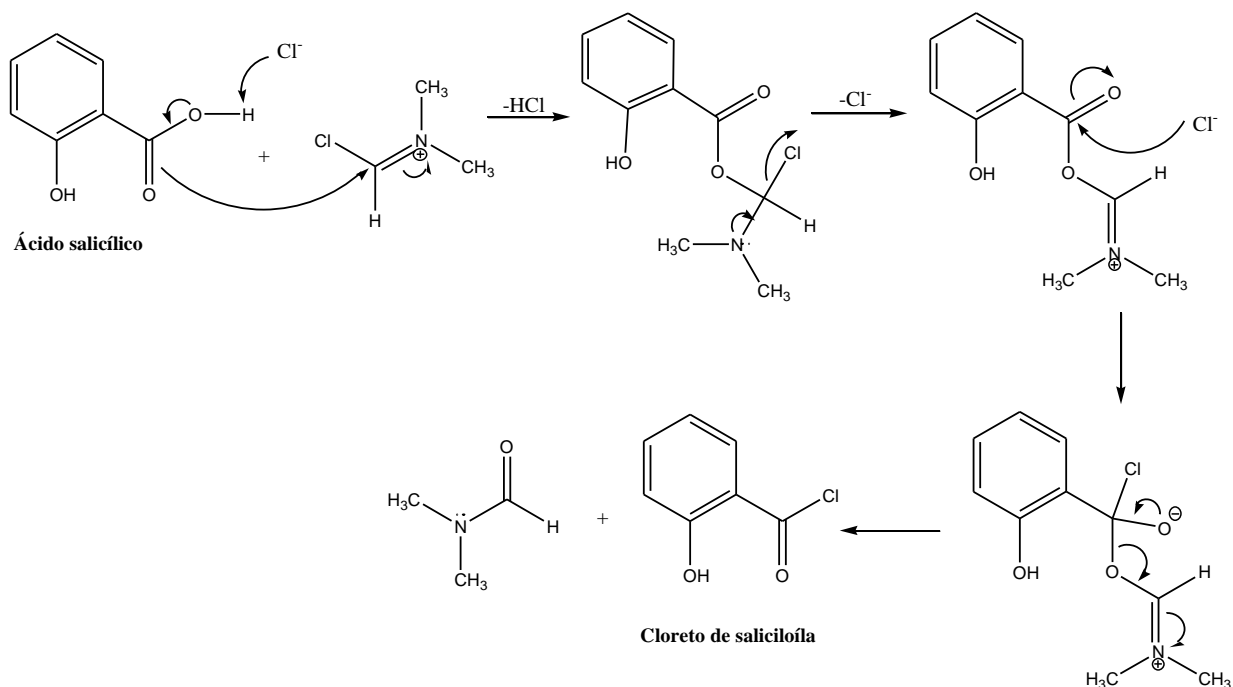


Figura 6 – Mecanismo de formação do cloreto de saliciloila.

O ataque nucleofílico do grupo amino do HisOMe (**A**) é facilitado devido à maior polarização no grupo acila, ou seja, ao aumento de eletrofilicidade causado pela substituição do grupo hidroxila pelo grupo retirador de elétrons cloro. O mecanismo é mostrado na Figura 7.^{18,22}

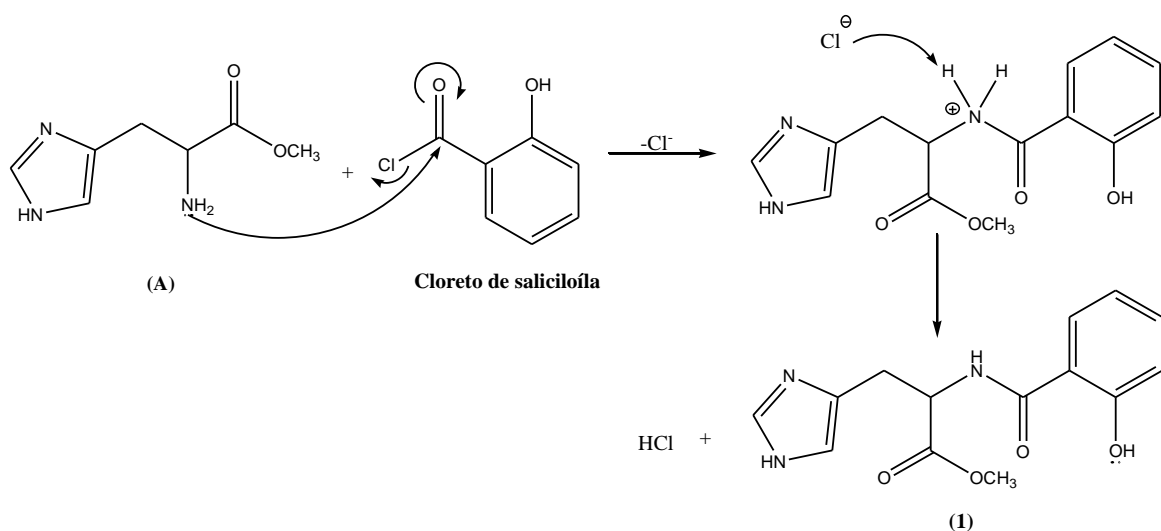


Figura 7 – Mecanismo de formação da ligação amida

O espectro de IV do produto (Figura 8) mostra bandas de absorção em 3325, 3176 e 3119 cm^{-1} , relativas ao estiramento das ligações N-H_{amina}, N-H_{Im} e O-H. O estiramento das ligações C=O dos grupos éster e amida estão presentes em 1744 e 1631 cm^{-1} respectivamente.

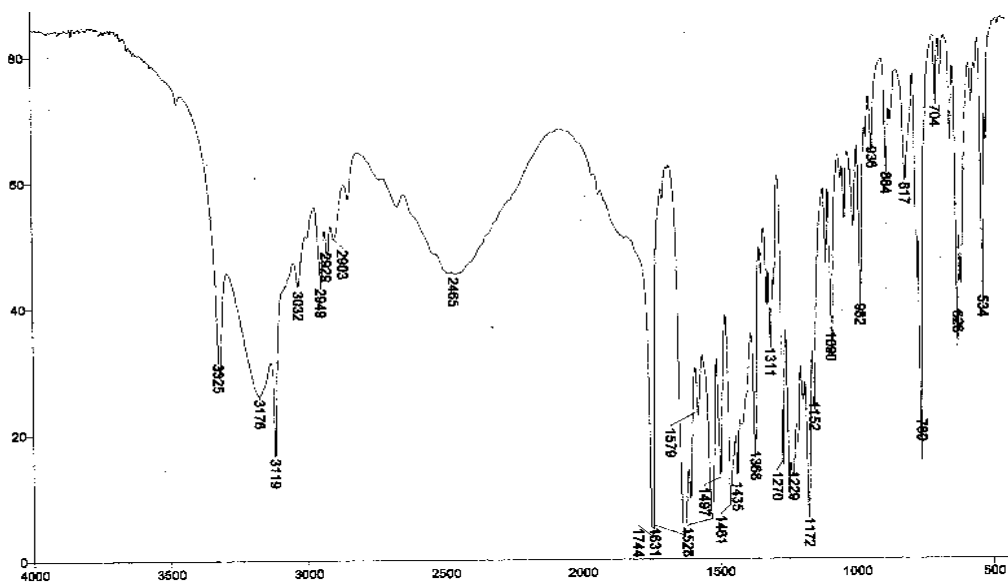


Figura 8 – Espectro de IV do composto (1) em pastilha de KBr.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 9) é observado um dubleto de um triplete em 4,72 ppm relativo ao hidrogênio metínico, em acoplamento com os 2 hidrogênios metilênicos (vizinhos ao Im) com $J=6,0$ Hz e o hidrogênio amídico com $J=6,4$ Hz. O hidrogênio da função amida aparece como um dubleto em 9,15 ppm ($J=6,4$ Hz). Na presença de D_2O (Figura 10), este sinal não é observado, confirmando a atribuição. A Tabela 2 apresenta os demais sinais observados e suas atribuições.

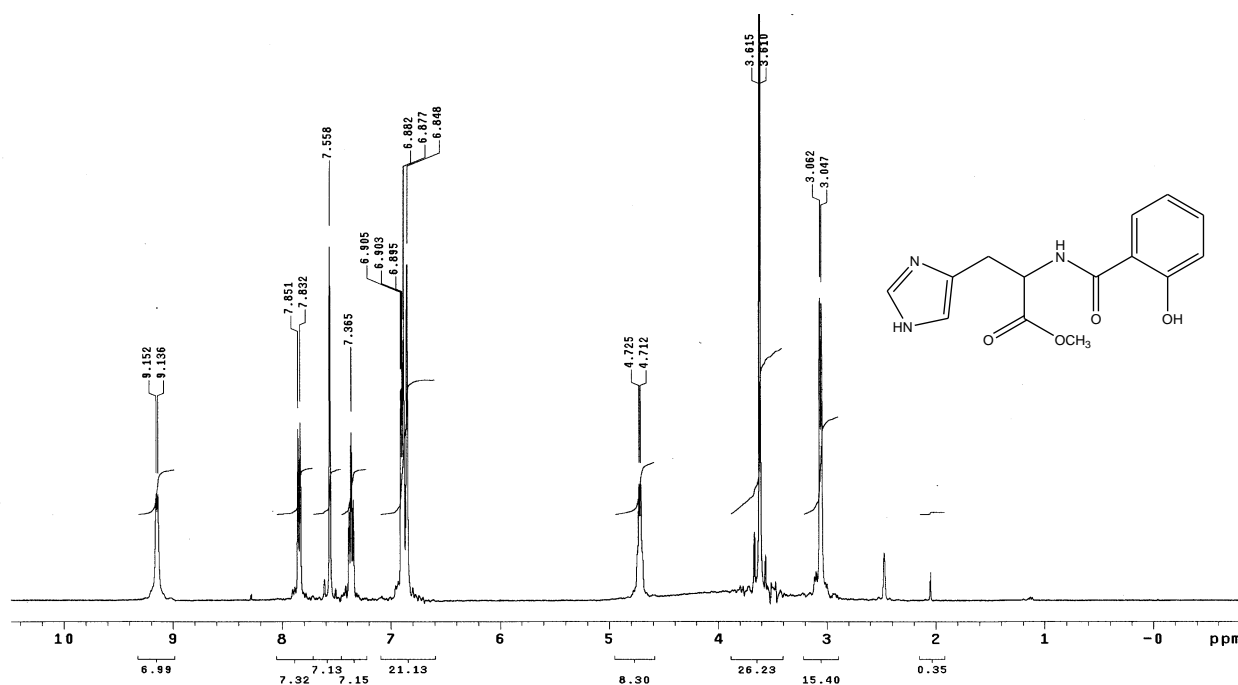


Figura 9 – Espectro de RMN de ^1H do composto **(1)** em DMSO-d_6 .

Tabela 2 – Sinais do espectro de RMN de ^1H do composto **(1)**.

Posição (δ)	Atribuição
9,15	R – NH – C=O (d, 1H, $J=6,4$ Hz)
7,85	Ar – H (d, 1H, $J=7,6$ Hz)
7,55	N – CH=N (Im, s, 1H)
7,36	Ar – H (s, 1H)
6,90 – 6,84	Ar – H (m, 2H); N – CH=C (Im, m, 1H)
4,72	R – CH – N (dt, 1H, $J=6,4$ e $6,0$ Hz)
3,61	R – OCH ₃ (s, 3H)
3,06	R – CH ₂ – Im (d, 2H, $J=6,0$ Hz)

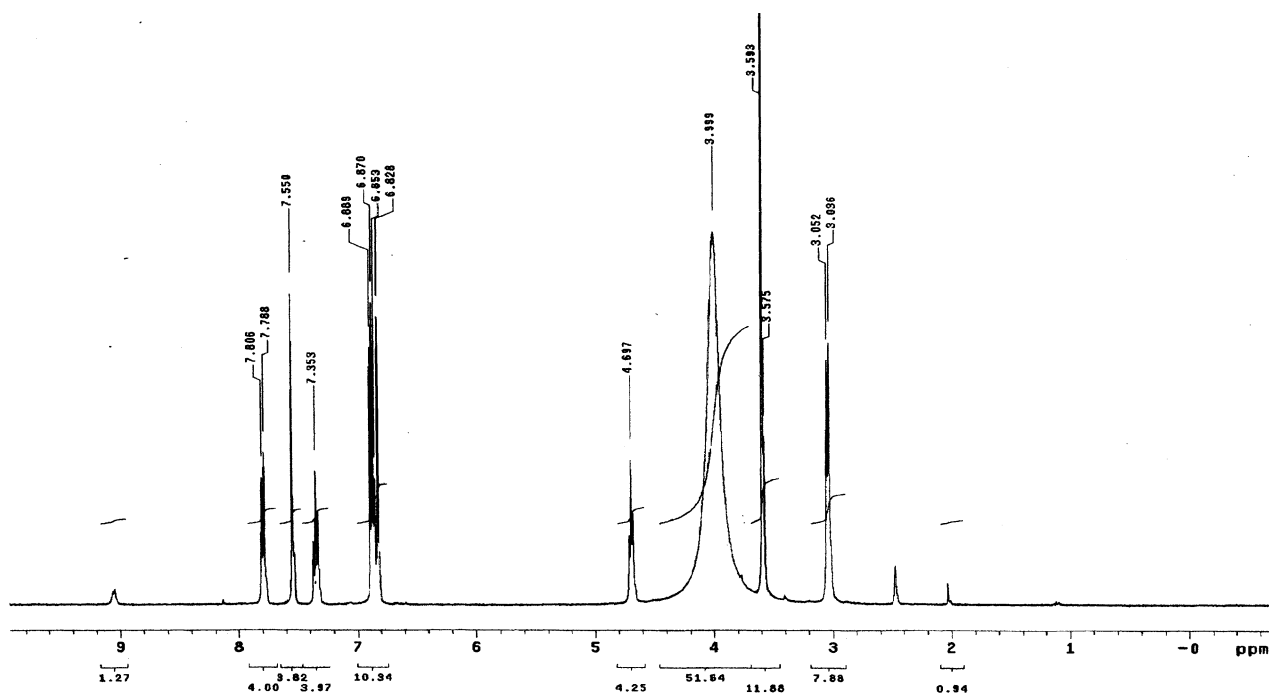


Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H do composto **(1)** em DMSO-d_6 com D_2O .

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 11) mostra sinais em 172,48 e 165,10 ppm, correspondentes respectivamente, aos carbonos das funções éster e amida. De 135,76 a 110,55 ppm são observados oito sinais, relativos a oito carbonos aromáticos. Os deslocamentos correspondentes aos demais carbonos estão sumarizados na Tabela 3.

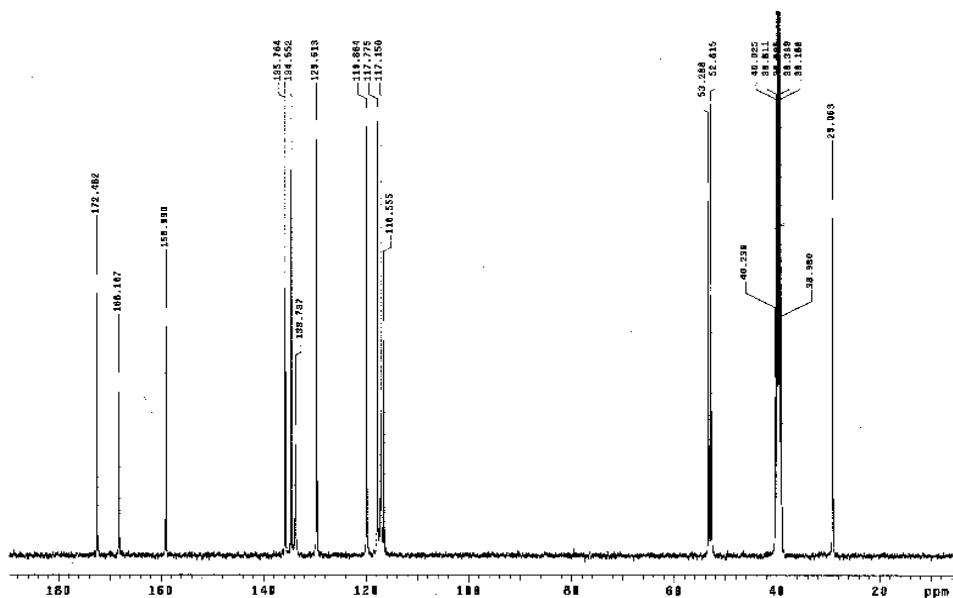


Figura 11 – Espectro de RMN de ^{13}C do (1) em DMSO-d_6 .

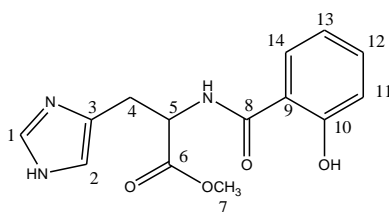


Tabela 3 – Sinais do espectro de RMN de ^{13}C do composto (1).

Posição (δ)	Atribuição
172,48	C_6
165,10	C_8
158,99	C_{10}
135,76	C_1
134,65	C_3
133,73	C_{12}
129,61	C_{14}
119,86	C_{13}
117,77	C_9
117,15	C_2
110,55	C_{11}
53,28	C_5
52,61	C_7
29,06	C_4

3.2. Síntese do composto Ácido 2-[[{(2-hidroxi-5-metilfenil)metil}amino-3-(1H-imidazol-4-il)]propanóico – (2).

A metodologia utilizada para a síntese do ligante H_2BHisMe foi a redução, utilizando NaBH_4 , da base de Schiff **(C)** gerada na reação de condensação entre a histidina e MFF **(B)**, permitindo a obtenção do produto puro com 37% de rendimento. Uma alternativa para a produção da amina secundária seria o uso de haletos de alquila, porém, o uso desta metodologia poderia levar à formação de subprodutos polialquilados de difícil separação.²⁵

O mecanismo proposto para formação da base de Schiff **(C)** ocorre pelo ataque nucleofílico do átomo de nitrogênio amínico da histidina ao átomo de carbono carbonílico do MFF **(B)***, seguido de desidratação conforme mostrado na Figura 12.²⁶

* Reagente cedido pelo LABINC- Lab. de Bioinorgânica e Cristalografia, Depto de Química – UFSC.

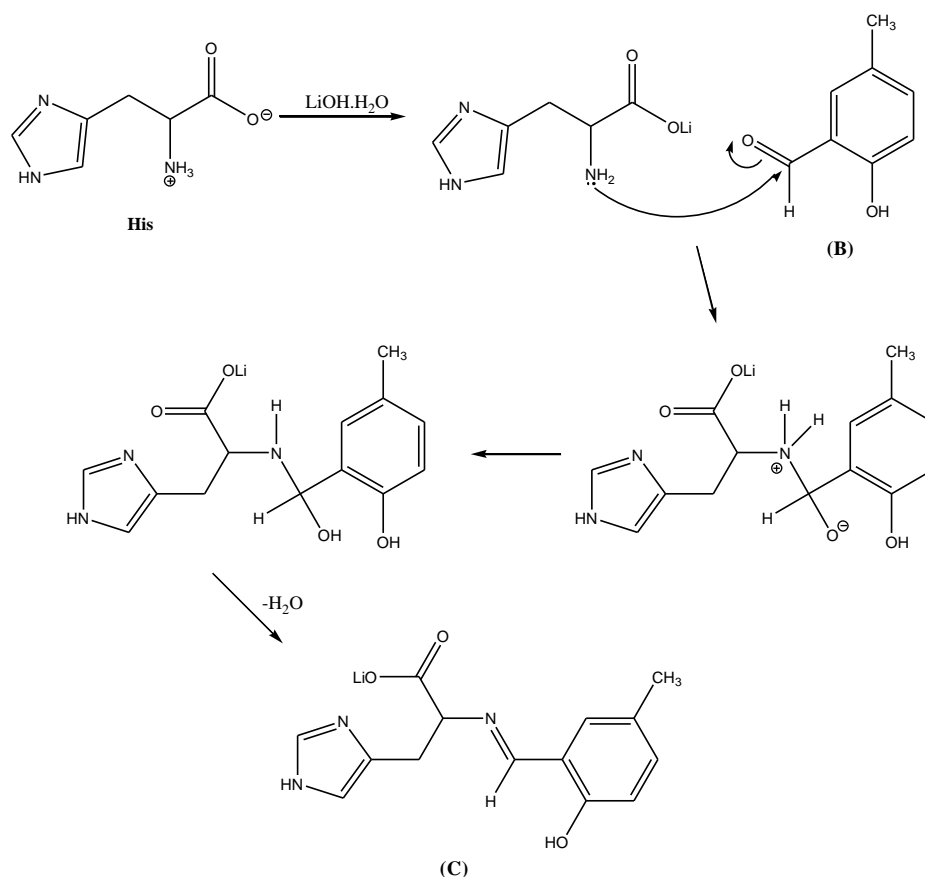


Figura 12 – Mecanismo de formação da base de Schiff (C).

O mecanismo da redução com NaBH_4 acontece através da sobreposição do orbital π^* da ligação $\text{C}=\text{N}$ (LUMO) e o orbital σ da ligação $\text{B}-\text{H}$ (HOMO) que resulta na transferência de hidreto conforme mostrado na Figura 13. O ânion produzido na primeira etapa estabiliza a molécula de BH_3 deficiente em elétrons, tornando-a novamente reativa para a transferência de hidreto. A adição de água leva à hidrólise do ânion e liberação da amina.^{25,26}

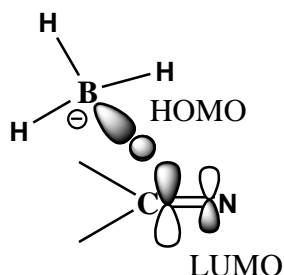


Figura 13 – Interação entre os orbitais LUMO da ligação $\text{C}=\text{N}$ (π) e HOMO da ligação $\text{B}-\text{H}$ (σ)

No espectro de IV do produto obtido (Figura 14) é observada a banda de absorção referente ao estiramento da ligação $\text{N}-\text{H}$ em 3098 cm^{-1} . As bandas de absorção correspondentes aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação $\text{C}=\text{O}$ no grupo carboxilato aparecem em 1599 e 1405 cm^{-1} .

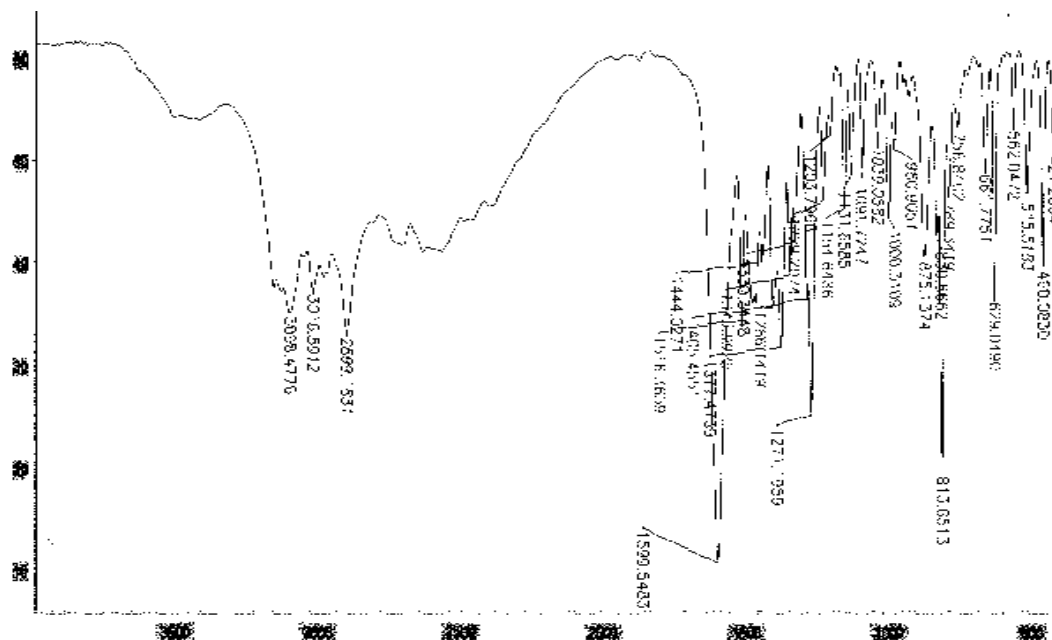


Figura 14 – Espectro de IV do composto **(2)** em pastilha de KBr.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 15) mostra dois dubletos, um em 6,85 ppm ($J = 5,8 \text{ Hz}$, 3H) e outro em 6,50 ppm ($J = 8,56 \text{ Hz}$, 1H) e um singlete em 7,59 ppm (1H), correspondentes à porção aromática da molécula. De 3,61 a 3,33 ppm é observado um multipeto, relativo ao hidrogênio metínico e aos dois hidrogênios do grupo metilênico ligado ao nitrogênio.

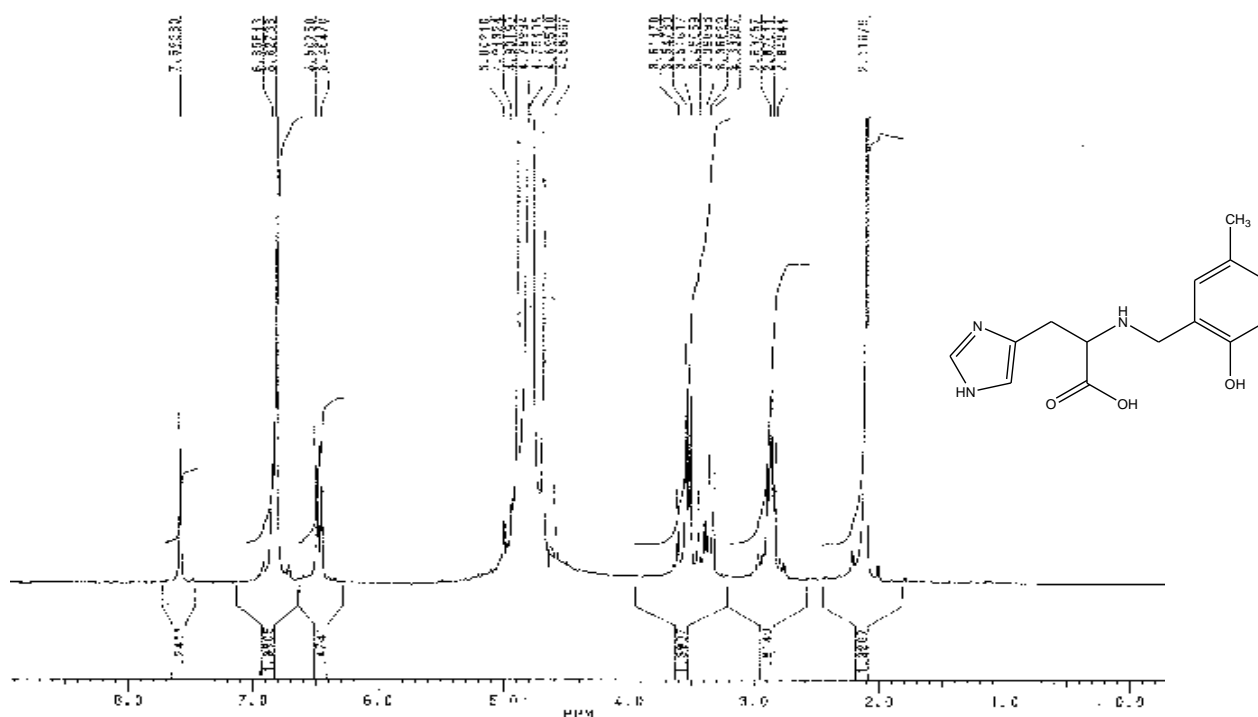


Figura 15 – Espectro de RMN de ¹H do composto **(2)** em D₂O/NaOD.

Tabela 4 – Sinais do espectro de RMN de H¹ do composto **(2)**.

Posição (δ)	Atribuição
7,59	N – CH=N (1m, s, H)
6,85	Ar – H (d, 3H, J= 5,81 Hz)
6,50	N – CH=C (1m, d, 1H, J= 8,56)
3,61	R – CH – N (m, 1H); Ar – CH ₂ – N (m, 2H)
2,89	R – CH ₂ – 1m (t, 2H, J= 10,84 Hz)
2,11	Ar – CH ₃ , (p-cresol, s, 3H)

O espectro de RMN de ¹³C (Figura 16) apresenta um sinal a 183,62 ppm relativo ao átomo de carbono do grupo carboxilato, seguido do átomo de carbono aromático da função fenol em 163,09 ppm. Os átomos de carbono metilênicos aparecem em 49,81 ppm (o-CH₂-cresol) e 31,40 ppm (CH₂-1m), confirmando a estrutura proposta para o composto **(2)**.

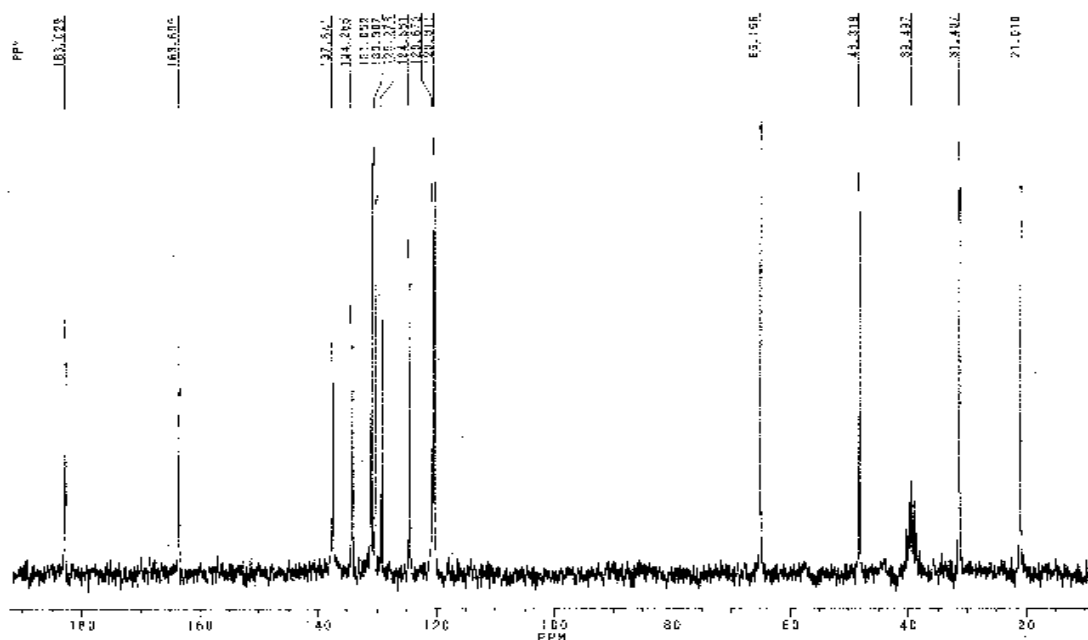


Figura 16 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **(2)** em $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$.

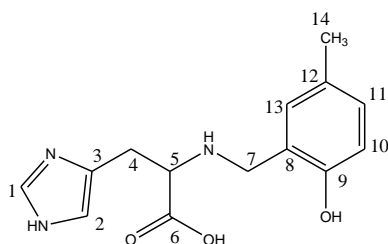


Tabela 5 – Sinais do espectro de RMN de ^{13}C do composto **(2)**.

Posição (δ)	Atribuição
183,62	C_6
163,69	C_9
137,54	C_1
134,28	C_3
131,05	C_{11}
130,30	C_{13}
129,27	C_{12}
124,55	C_8
120,67	C_2
120,31	C_{10}
65,15	C_5
48,31	C_7

31,40	C ₄
21,01	C ₁₄

3.3. Síntese do composto 2-[(2-hidroxibenzoil)amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)]propanoato de metila – (3).

A metodologia utilizando catálise ácida para a esterificação do H₂BHis (**D**) permitiu a obtenção do produto desejado com 85% de rendimento. Este resultado pode ser considerado bastante satisfatório levando em consideração a natureza reversível desta reação.

O mecanismo proposto para reação é representado na Figura 17. O catalisador ácido doa um próton ao grupo carboxílico, favorecendo o posterior ataque nucleofílico do álcool, que gera o intermediário tetraédrico (I). Este intermediário se rearranja perdendo uma molécula de água, que captura o próton do éster, regenerando o catalisador.

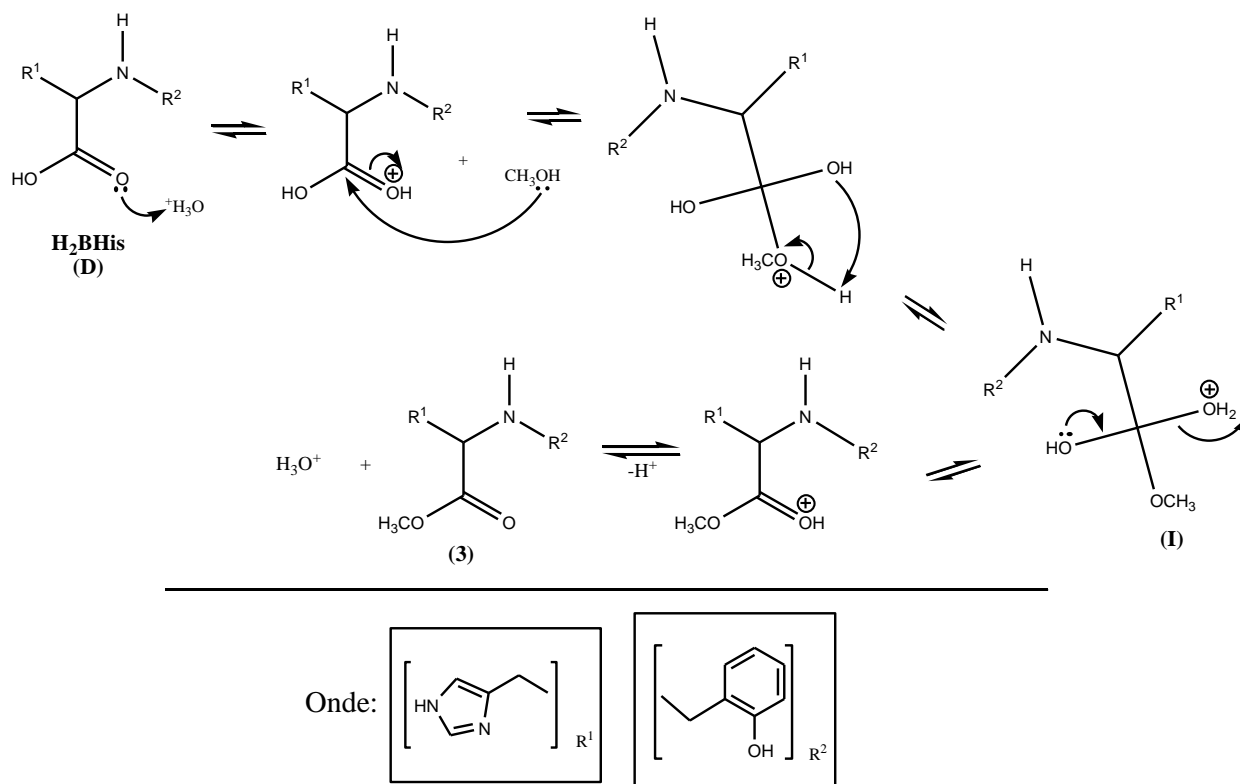


Figura 17 – Mecanismo de esterificação do precursor (**D**)

Os resultados obtidos para a análise de IV e RMN de ^1H e de ^{13}C concordam com os da literatura.²⁷ No espectro de IV (Figura 18) podem ser observadas bandas de absorção em 3335 e 3217 cm^{-1} , respectivas ao estiramento das ligações N-H_{amina}, N-H_{Im} e O-H. O estiramento da ligação C=O está presente em 1734 cm^{-1} .

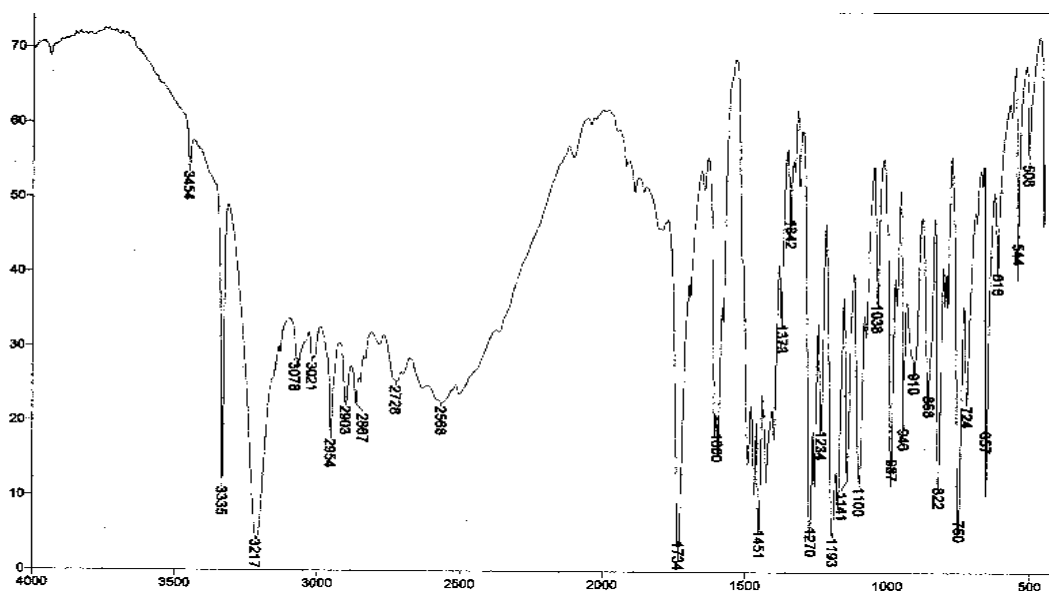


Figura 18 – Espectro no IV do composto **(3)** em pastilha de KBr.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 19), a porção aromática (6H) aparece na região entre 7,07 e 6,70 ppm. O multiplete de 3,65 a 3,58 ppm, é correspondente aos dois hidrogênios metilênicos vizinhos ao grupo fenol e o singlete centrado em 3,52 ppm, referente aos hidrogênios da metoxila do éster.

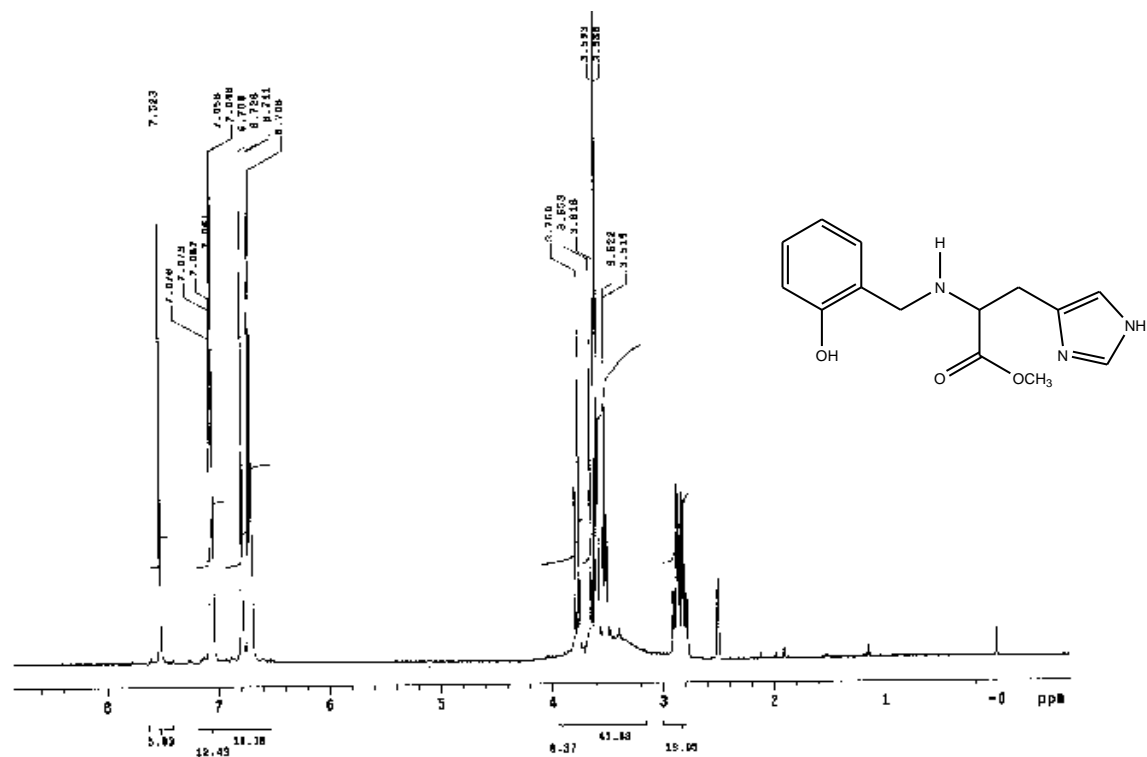


Figura 19 – Espectro de RMN de ^1H do composto **(3)** em DMSO-d_6 .

Tabela 6 – Sinais do espectro de RMN de ^1H do composto **(3)**.

Posição (δ)	Atribuição
7,52	N – CH=N (lm, s, 1H)
7,07	Ar – H (m, 2H)
6,78	N – CH=C (lm, s, 1H)
6,72	Ar – H (t, 2H, $J=8,0$ Hz)
3,76	R – CH – N (s, 1H)
3,65	Ar – CH ₂ – N (m, 2H)
3,52	R – OCH ₃ (s, 3H)
2,85	R – CH ₂ – lm (dq, 2H)

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 20) apresenta sinais em 174,37 e 51,90 ppm correspondentes aos átomos de carbono carbonílico e metílico da função éster.

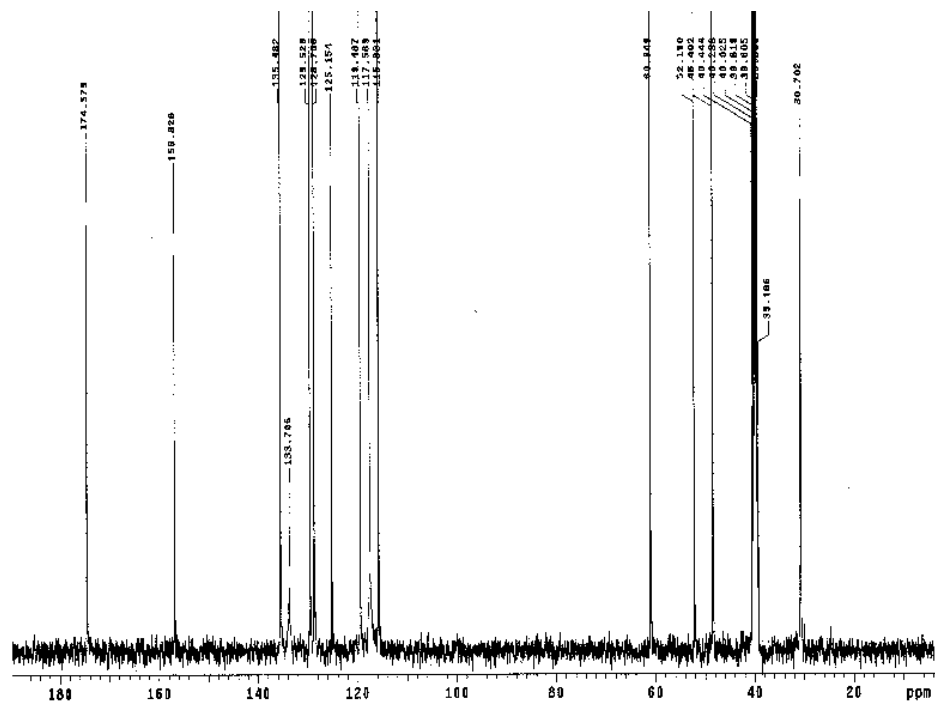


Figura 20 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **(3)** em DMSO-d_6 .

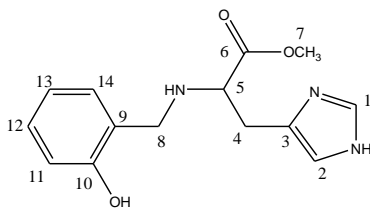


Tabela 7 – Sinais do espectro de RMN de ^{13}C do composto **(3)**.

Posição (δ)	Atribuição
174,37	C_6
158,82	C_{10}
135,48	C_1
133,70	C_3
129,52	C_{12}
128,70	C_{14}
125,15	C_{13}
118,48	C_9
117,56	C_2
115,99	C_{11}

60,94	C ₅
52,19	C ₇
45,40	C ₈
30,70	C ₄

Na tentativa de mimetizar o resíduo do aminoácido serina, foi realizada a redução do composto **(3)** conforme o esquema da Figura 21. Para tanto, foi utilizado LiAlH₄, um forte agente redutor, sob refluxo em THF (60-70 °C) por um período de 72 h. O produto isolado mostrou no espectro de RMN ¹³C (Figura 22) um sinal em 174,78 ppm, relativo a carbonila do grupo éster. Isto demonstra que a redução desta função, neste caso, exige condições a serem estudadas, pois ésteres são facilmente reduzidos por LiAlH₄.

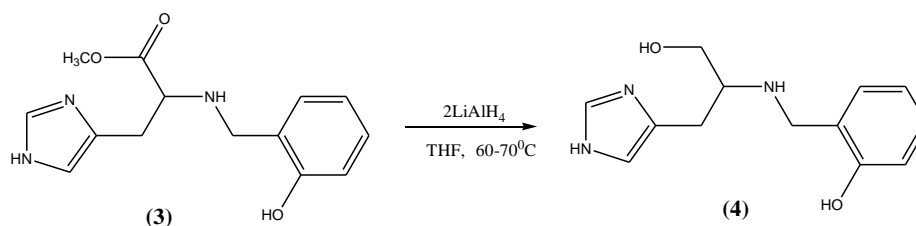


Figura 21 – Representação do método usado para redução do composto **(3)**.

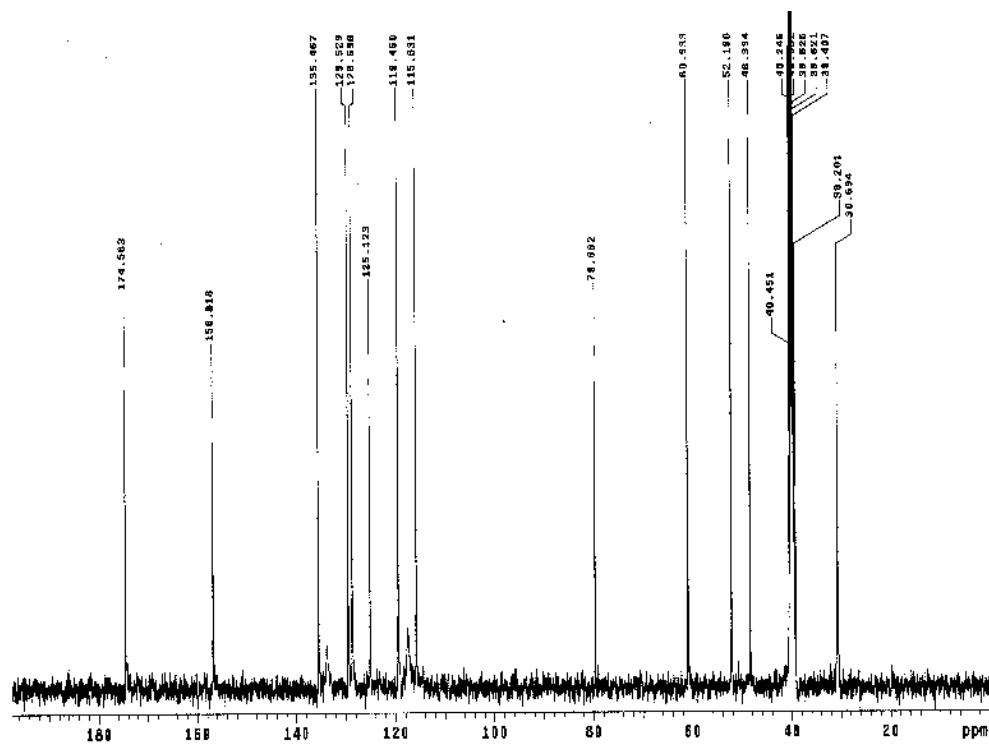


Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C em DMSO-d_6 , do produto isolado da redução com LiAlH_4

4. CONCLUSÃO

Os novos compostos **(1)** e **(2)**, foram sintetizados e caracterizados com bons rendimentos através de metodologias clássicas propostas, levando em consideração, a dificuldade imposta em sínteses contendo diferentes funções potencialmente reativas, como os grupos imidazol e fenol.

Estes compostos podem ser considerados potenciais ligantes contendo grupos N, O doadores, os quais mimetizam os resíduos de histidina, tirosina e aspartato.

A polifuncionalidade apresentada pelos mesmos, dá a oportunidade de que, no futuro, sejam utilizados como precursores na síntese de novos compostos contendo outros resíduos de aminoácidos, buscando modelos mais fiéis do sítio ativo de metaloenzimas como a Urease e as PAP's.

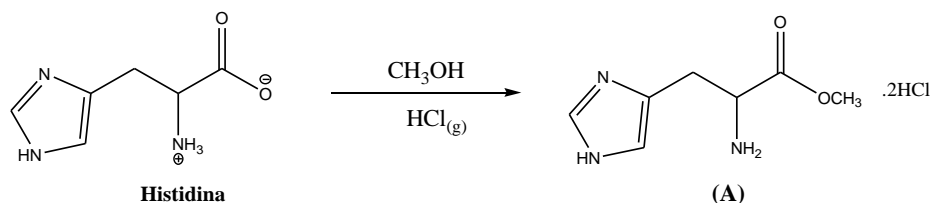
5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Materiais e Métodos

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Microquímica, modelo MQAPF-31. Os espectros de IV foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo System 200 FT-IR. Os espectrofotômetros Bucker 200 MHz e Varian 400 MHz foram utilizados para determinação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , tendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Em todos os procedimentos, foram utilizados reagentes e solventes de pureza analítica procedentes da Aldrich, Carlo Erba, Fluka, Grupo Química e Nuclear. A purificação dos mesmos foi realizada, quando necessário, usando metodologias descritas na literatura.²⁸ Nas sínteses, a formação dos produtos foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando como adsorvente sílica gel 60 F₂₅₄ Riedel-de Rään.

5.2. Procedimentos empregados nas sínteses.

5.2.1. Metil-2-amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)propanoato dihidrocloro – (A).



Em um balão contendo 50,0 mL de metanol seco foram suspensos 4,65g (30 mmol) de histidina e sobre esta suspensão, foi purgado $\text{HCl}_{(g)}$ durante 1h. A solução resultante foi refluxada (75 °C), sob agitação por 2h e deixada em repouso por 12h a temperatura ambiente. O sólido formado foi filtrado, lavado com éter e seco em estufa (100 °C).

PF: 209 – 211 °C (Lit.²⁷ 209 – 211 °C)

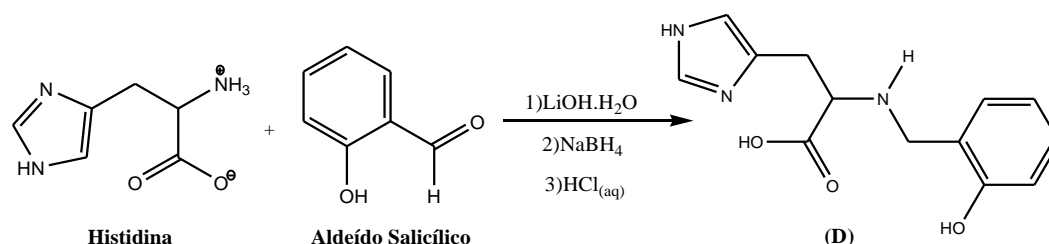
RENDIMENTO: 88%

IV (KBr, cm^{-1}): 3350, ν (N-H_{Alif}, N-H_{Im}, O-H); 3018, ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}); 1738, ν (C=O_{éster}); 1618, ν (C-C_{Im}, N-C_{Im}); 810, δ (C-H_{Ar}).

CALCULADO PARA $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ – C: 34,73% ; H:5,41% ; N: 17,36%.

ENCONTRADO – C: 33,46% ; H: 4,75% ; N: 17,89%.

5.2.2. Ácido 2-[(2-hidroxifenilmetil)-amino-3-(1H-imidazol-4-il)]propanóico – (D)



A uma suspensão de 1,55g (10,0 mmol) de histidina e 0,42g de $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10,0 mmol) em metanol (20,0mL), sob agitação a 0 °C, foi adicionado uma solução de 1,22g (10,0 mmol) de aldeído salicílico em 10mL de metanol. A solução foi deixada sob agitação por mais 4h e então, foi adicionado 0,38g NaBH_4 (10,0 mmol) em uma porção. Após 24h, a mistura foi concentrada em rotaevaporador, dissolvida em água e neutralizada com $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 1 mol/L. O sólido formado foi filtrado em funil de placa porosa, resultando em um sólido branco lavado com acetona, éter etílico e clorofórmio e seco em bomba de vácuo.

PF: 240 – 242 °C (Lit.²⁷ 240 – 242 °C)

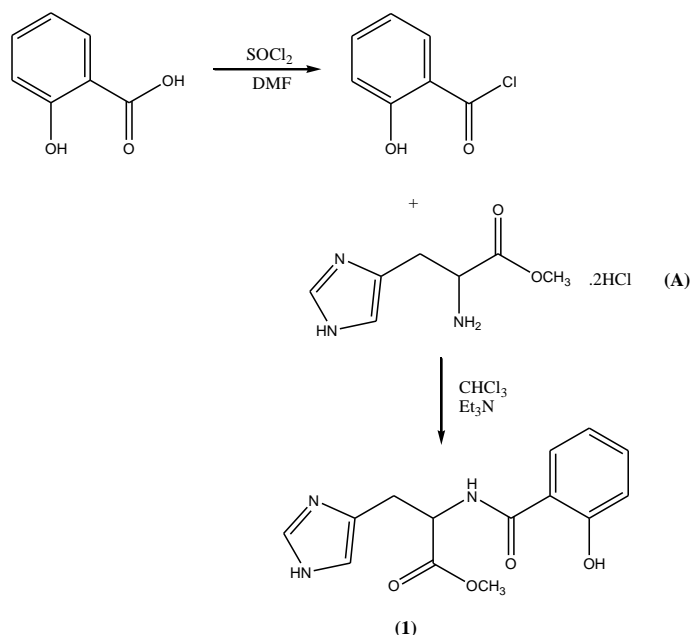
RENDIMENTO: 95%

IV (KBr, cm^{-1}): 3114, ν (N-H_{Alif}, N-H_{Im}); 3014 – 2970, ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}); 1602, ν_{as} (COO^-); 1406, ν_{s} (COO^-); 780, δ (C-H_{Ar}).

CALCULADO PARA $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$ – C: 59,80% ; H:5,70% ; N: 16,10%.

ENCONTRADO – C: 59,30% ; H: 5,41% ; N: 15,70%.

5.2.3. 2-[(2-hidroxibenzoil)amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)] propanoato de metila – (1)



Em um balão contendo 0,50g (3,62mmol) de ácido salicílico foi adicionado 1,0mL (13,7 mmol) de SOCl_2 e algumas gotas de DMF. A mistura foi colocada sob agitação e aquecimento (65-70°C) por 2h e após este período foi concentrada sob nitrogênio (N_2), resultando em um óleo amarelo claro. Uma solução do produto em clorofórmio (15mL) foi adicionada, gota a gota, sobre uma solução resfriada (banho de gelo) do composto **(A)** (0,86g, 3,62 mmol), contendo trietilamina (TEA) (1,5mL, 10,86 mmol) em clorofórmio (30mL) sob agitação. Após adição, o banho foi retirado e a mistura deixada sob agitação por mais 72h, depois, transferida para funil de separação juntamente com 50,0mL de solução saturada de NH_4Cl e agitada vigorosamente, levando à formação de um sólido amarelo claro na interfase. O produto foi separado por filtração em funil de Buchner e lavado com água e acetona, resultando em um sólido bege claro, seco em *dry oven* a 60°C por 12h.

PF: 204 – 206 °C (dec.)

RENDIMENTO: 39%

IV (KBr, cm^{-1}): 3325 e 3175, ν (N-H_{Alif}, N-H_{Im}, O-H); 3032-2903, ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}); 1744, ν (C=O_{éster}); 1631, ν (C=O_{amida}); 1579, ν (C-C_{Im}, N-C_{Im}); 750, δ (C-H_{Ar}).

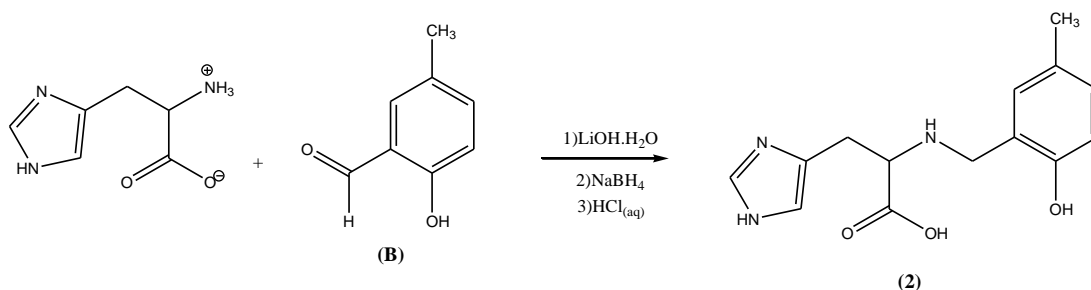
RMN de ^1H – (DMSO- d_6 , ppm): 9,15 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz); 7,85 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz); 7,55 (s, 1H); 7,36 (s, 1H); 6,90 – 6,84 (m, 3H); 4,72 (dt, 1H, $J = 6,4$ e 6,0 Hz); 3,61 (s, 3H); 3,06 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz).

RMN de ^{13}C – (DMSO- d_6 , ppm): 172,48; 165,10; 158,99; 135,74; 134,55; 133,73; 129,51; 119,86; 117,77; 117,15; 110,55; 53,28; 52,61; 29,06.

CALCULADO PARA $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4 \cdot 5\frac{1}{2} \cdot \text{H}_2\text{O}$ – C: 43,29% ; H: 6,74% ; N: 10,82%.

ENCONTRADO – C: 43,26% ; H: 6,45% ; N: 10,06%.

5.2.4. Ácido 2-[(2-hidroxi-5-metilfenil)metil]amino-3-(1H-imidazol-4-il)]propanóico – (2).



A uma suspensão de 1,55g (10,0 mmol) de histidina e 0,42g de $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10,0 mmol) em metanol (30,0mL), sob agitação a 0 °C, foi adicionado uma solução de 1,63g (10,0 mmol) do composto **(B)** em 10mL de metanol. A solução foi deixada sob agitação por mais 4h e então, foi adicionado 0,38g NaBH_4 (10,0 mmol) em uma porção. Após 24h, a mistura foi concentrada em rotaevaporador, dissolvida em água e neutralizada com $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 1 mol/L. O sólido formado foi filtrado em funil de placa porosa, resultando em um pó róseo lavado com acetona, éter etílico e clorofórmio e seco em bomba de vácuo.

PONTO DE FUSÃO: 218-220 °C.

RENDIMENTO: 37%

IV (KBr, cm^{-1}): 3098, ν (N-H, O-H); 2899, ν (C- H_{Ar}); 1599, ν (C=O_{as}); 1516, ν (C-C_{Im}, N-C_{Im}); 1405, ν (C=O_s); 813, δ (C- H_{Ar}).

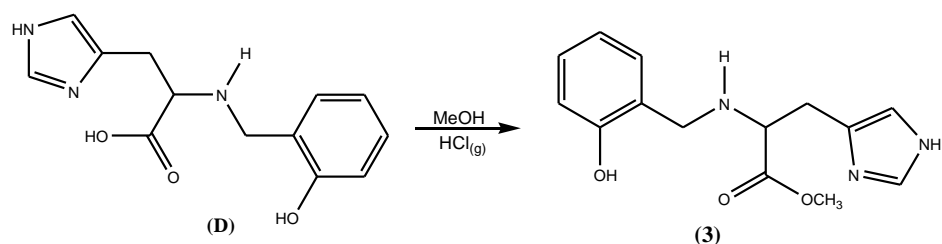
RMN de ^1H – ($\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$, ppm): 7,59 (s, 1H); 6,85 (dd, 3H, $J = 5,81$ e 8,56 Hz); 6,50 (d, 1H, $J = 8,56$ Hz); 3,61-3,33 (m, 3H); 2,89 (t, 2H, $J = 10,85$ Hz); 2,11 (s, 3H).

RMN de ^{13}C – ($\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$, ppm): 183,02; 163,69; 137,64; 134,28; 131,05; 130,30; 129,27; 124,55; 120,67; 120,31; 65,15; 48,31; 31,07, 21,01.

CALCULADO PARA $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ – C: 61,08% ; H: 6,22% ; N: 15,26%.

ENCONTRADO – C: 60,83% ; H: 6,12% ; N: 15,09%.

5.2.5. 2-[(2-hidroxifenilmetil)-amino-3-(1*H*-imidazol-4-il)]propanoato de metila – (3)



A uma suspensão de 7,80g (30 mmol) do composto **(D)** em metanol seco (75mL) sob agitação, foi purgado $\text{HCl}_{(\text{g})}$ durante 10min. A solução resultante foi deixada 48h sob agitação, concentrada, dissolvida em água e neutralizada com $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$. O produto foi extraído com clorofórmio (3 vezes, 50mL), a fase orgânica seca com sulfato de sódio (Na_2SO_4) e filtrada. O solvente foi removido sob vácuo resultando em um sólido branco.

PONTO DE FUSÃO: 128-129 °C (Lit.²⁷ 128-129 °C)

RENDIMENTO: 85%

IV (KBr , cm^{-1}): 3335 e 3217, ν (N-H_{Alif} , N-H_{Im} e O-H); 3078-2568, ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}); 1734, ν ($\text{C=O}_{\text{éster}}$); 1600, ν (C-C_{Im} , N-C_{Im}); 750, δ (C-H_{Ar}).

RMN de ^1H – (DMSO-d_6 , ppm): 7,55 (s, 1H); 7,09 (m, 1H); 6,70 (m, 5H); 3,95-3,65 (m, 6H); 2,80 (m, 2H)..

RMN de ^{13}C – (DMSO-d_6 , ppm): 174,37; 158,82; 135,48; 133,70; 129,52; 128,70; 125,15; 119,48; 117,56; 115,99; 60,94; 52,19; 45,40; 30,70.

CALCULADO PARA $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ – C: 61,08% ; H: 6,22% ; N: 15,26%.

ENCONTRADO – C: 61,46% ; H: 6,67% ; N: 15,09%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 – NELSON, D. L., COX, M. M. L., Principles of biochemistry, 3rd Ed., Worth Publishers, New York, 2000, pg 213-272.
- 2 – MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYER, P.A., RODWELL, V.W., Harper's Illustrated Biochemistry, 26th Ed., McGraw-Hill Medical, New York, 2003, pg 14-60.
- 3 – STRYER, L., Bioquímica, 4^o Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996, pg 171-190.
- 4 – FRUTON, J.S.; Molecules in life, Wiley- Interscience, New York, 1972.
- 5 – LIPPARD, S. J., BERG, J. M.; Principles of Bioinorganic Chemistry, University Science Books, California, 1994, pg 3-8.
- 6 – GREATTI, A.; Síntese, caracterização e reatividade de novos complexos binucleares de Ni (II) modelos para hidrolases, Tese de Doutorado, Departamento de Química, UFSC, 2004, pg 16-18.
- 7 – HALCROW, M., CHRISTOU, G. Biomimetic chemistry of nickel. Chemical Review , v. 94, p. 2421-2481, 1994.
- 8 – KARPLUS, P. A., JABRI, E., CARR, M. B. *et al.* The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. Science, v. 268, p. 998-1004, 1995.
- 9 – BRITO, M. A., Models for the active site structure of Purple Acid Phosphatases. South. Braz. J. Chem., v. 4(4), p. 19-26, 1996.
- 10 – STRÄTER, N., KLABUNDE, T., TUCKER, P., WITZEL, H., KREBS, B., Crystal Structure of a Purple Acid Phosphatase Containing a Dinuclear Fe(III)-Zn(II) Active Site. Science, v. 268, p. 1489-1492, 1995.
- 11 – KLABUNDE, T., STRÄTER, N., KREBS, B., WITZEL, H., Structural Relationship between the Mammalian Fe(III)-Fe(II) and the Fe(III)-Zn(II) Plant Purple Acid Phosphatases. FEBS Letters, v.367, p. 56-60, 1995.
- 12 – LINDQVIST, Y., JOHANSSON, H., KAIJA, H., VIHKO, P., SCHNEIDER, G., Three dimensional Structure of a Mammalian Purple Acid Phosphatase at 2.2 Å Resolution with a μ -(Hydroxo) Bridged Di-iron Center. J. Mol. Biol., v.291, p. 135-147, 1999.
- 13 – CFS Nutrition. L – Aminoacids. Disponível em www.cfsn.com. Acesso em 21/10/2005.
- 14 – MORGAN, P. Vitaminstuff. Disponível em www.vitaminstuff.com/aminoacid . Acesso em 21/10/2005.

- 15 - JOULE, J. A. Heterocyclic Chemistry, 3rd ed., Stanley Thormes Publishers Ltda, New York, 1996, cap. 20-21.
- 16 - UNIVERSITY OF MAINE, The serine proteases. Disponível em <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY252/Peptidase3.html>. Acesso em 21/10/2005.
- 17 - JONES, J., The Chemical Synthesis of Peptides, International Series of Monographs on Chemistry, 23, Oxford Science Publications, 1991, cap. 5.
- 18 - BODANSZKY, M., Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2nd Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1993, cap. V.
- 19 - DUARTE, C., Síntese Estereosseletiva de Alcalóides e N-Heterociclos, Série de textos da Escola de Verão em Química II, Editora da UFSCar, São Carlos, 2001.
- 20 - BECKWITH, A. L. J., The chemistry of amides, Interscience Publishers, London, 1970, cap. 2.
- 21 - ZAORAL, M., ARNOLD, Z., Chem. Abst., v., 56, p. 8836, 1961.
- 22 - MARSON, C. M., GILLES, P.R., Synthesis using Vismeyer Reagents, CRC Press, London, 1994, p. 1-25, 109-112.
- 23 - SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C., Spectrometric Identification of Organic Compounds, 3rd Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1974, c. 3-4.
- 24 - BREITMAIER, E., Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry, A practical Guide, 3rd Ed., John Wiley & Sons, Inc., c. 2.
- 25 - MORRISON, R., BOYD, R., Química Orgânica, 13^a Ed., Fundação Calouste Gulbekian, Lisboa, 1996, p. 1078-1085.
- 26 - CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN, S., WOTHERS, P., Organic Chemistry, Oxford University Press, New York, 2001, p. 140-145.
- 27 - MIRESKI, S.L. Síntese e caracterização de ligantes derivados do aminoácido histidina para formação de complexos modelos estruturais e/ou funcionais de metaloenzimas. Tese de conclusão de curso, Departamento de Química, UFSC, 2004. pg 26-40.
- 28 - VOGEL, A.I., Textbook of Practical Organic Chemistry. 5th Ed. Longman Scientific & Technical, England, 1989, p. 762.